

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 221**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2011** **E 11709065 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 2544708**

54 Título: **Procedimiento de conjugación de polisacáridos bacterianos con proteínas transportadoras**

30 Prioridad:

09.03.2010 GB 201003922

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.09.2015

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**BIEMANS, RALPH LEON;
DUVIVIER, PIERRE y
GAVARD, OLLIVIER FRANCIS NICOLAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 545 221 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de conjugación de polisacáridos bacterianos con proteínas transportadoras

La presente invención se refiere a un procedimiento de conjugación. En particular, se refiere a la conjugación de sacáridos y proteínas utilizando aminación reductora.

5 **Antecedentes**

Los polisacáridos capsulares bacterianos han sido utilizados ampliamente en inmunología durante muchos años para la prevención de la enfermedad bacteriana. Un problema con un uso de este tipo, sin embargo, es la naturaleza T-independiente de la respuesta inmunitaria. Estos antígenos son por tanto poco inmunogénicos en niños pequeños. Este problema se ha superado a través de la conjugación de los antígenos polisacáridos con una proteína transportadora (una fuente de epítomos de linfocitos T cooperadoras) que pueden entonces utilizarse para provocar una respuesta inmunitaria T-dependiente, incluso en el primer año de vida.

Se conocen diversas técnicas de conjugación en la técnica. Los conjugados pueden prepararse mediante procedimientos de aminación reductora directa como se describe en los documentos US200710184072 (Hausdorff), US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Se describen otros procedimientos en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508. El procedimiento de conjugación puede depender como alternativa de la activación de grupos hidroxilo del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. Dichos conjugados se describen en la solicitud publicada del PCT WO 93/15760 Universidad de Servicios Uniformados y WO 95/08348 y WO 96/29094. Véase también Chu C. y col. *infect. Immunity*, 1983 245 256.

La aminación reductora implica das etapas, (1) la oxidación del antígeno, (2) la reducción del antígeno y de una proteína transportadora para formar un conjugado. La etapa de oxidación puede implicar la reacción con peryodato, sin embargo la oxidación por peryodato puede conducir a la reducción de tamaño (documento WO94/05325).

Sumario de la invención

Los inventores han descubierto sorprendentemente que el uso de concentraciones más bajas de peryodato en presencia de fosfato bajo puede conducir a la retención del tamaño y/o la retención de los epítomos.

25 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para conjugar un sacárido o sacáridos bacterianos que comprende las etapas

a) hacer reaccionar el sacárido bacteriano con 0,001-0,7, (por ejemplo 0,005-0,5, 0,01-0,5, 0,1-0,5, o 0,1-0,2) equivalentes molares de peryodato para formar un sacárido bacteriano activado;

b) mezclar el sacárido bacteriano activado con una proteína transportadora;

30 c) hacer reaccionar el sacárido bacteriano activado y la proteína transportadora con un agente reductor para formar un conjugado;

o

a) hacer reaccionar el sacárido bacteriano con 0,001-0,7, (por ejemplo, 0,005-0,5, 0,01-0,5, 0,1-0,5, o 0,1-0,2) equivalentes molares de peryodato para formar un sacárido bacteriano activado;

35 b) mezclar el sacárido bacteriano activado con un enlazador;

c) hacer reaccionar el sacárido bacteriano activado con el enlazador utilizando un agente reductor para formar un sacárido bacteriano-enlazador;

d) hacer reaccionar el sacárido bacteriano-enlazador con una proteína transportadora para formar un conjugado,

40 en el que la etapa a) se produce en un tampón que no contiene un grupo amino y el tampón tiene una concentración de entre 1-100 mM.

Se desvela un conjugado obtenible mediante el procedimiento de la invención.

Se desvela un conjugado obtenido mediante el proceso de la invención.

Se desvela una composición inmunogénica que comprende el conjugado de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

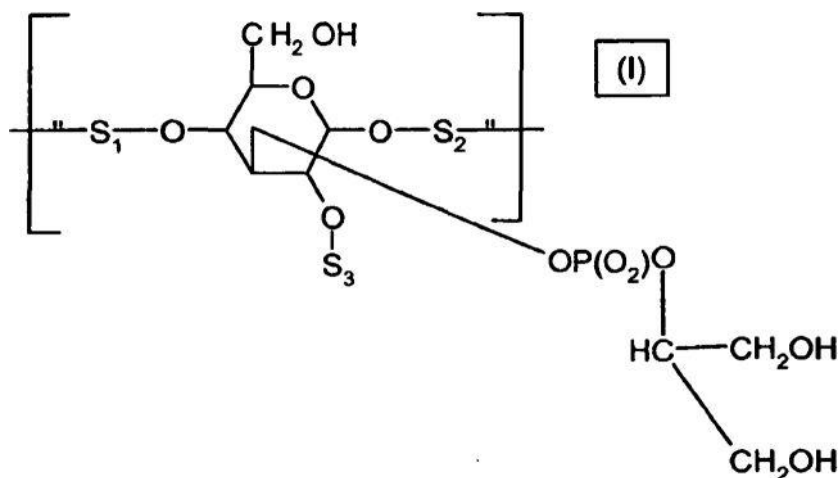
45 Se desvela una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención.

Se desvela un uso de la composición inmunogénica de la invención o de la vacuna de la invención en la prevención o el tratamiento de la enfermedad bacteriana.

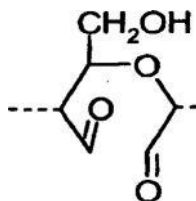
Se describe un uso de la composición inmunogénica de la invención o de la vacuna de la invención en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la enfermedad bacteriana.

50 Se desvela un procedimiento para prevenir o tratar la infección bacteriana que comprende la administración de la composición inmunogénica de la invención o de la vacuna de la invención a un paciente.

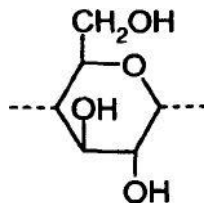
Se desvela un sacárido bacteriano activado, en el que el sacárido bacteriano activado comprende una unidad de repetición de fórmula (I):



- 5 en la que el sacárido bacteriano activado comprende n unidades de repetición y n está entre 2 y 2400, entre 500 y 2000, entre 750 y 1500, entre 1000 y 2000 o entre 1500 y 2300.
 En la que al menos el 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 % o 30 % pero menos del 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 30 % o 50 % de S1 es

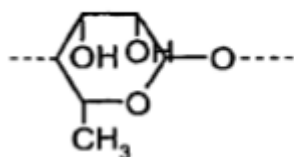


y el resto es

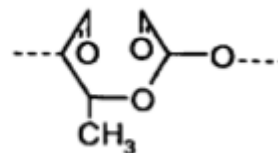


10

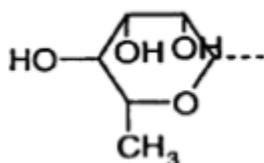
en la que S2 es



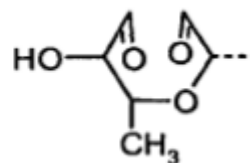
o



y en la que S3 es



o



15 **Descripción de los dibujos**

Figura 1. Tamaño de los polisacáridos 23F y 6B después del tratamiento con peryodato. La línea marcada con triángulos muestra el tamaño de 6B en tampón fosfato 10 mM, la línea marcada con diamantes muestra el

tamaño de 23F en tampón fosfato 10 mM y la línea marcada con cuadrados muestra el tamaño de 23F en tampón fosfato 100 mM.

Figura 2. Comparación de la inmunogenicidad de 23F conjugado utilizando ya sea CDAP o conjugación de aminación reductora. El gráfico a) describe los resultados de un ensayo ELISA. El gráfico b) describe los resultados de un ensayo de opsonofagocitosis.

Figura 3. Evaluación de la inmunogenicidad de PS06B-CRM conjugado utilizando los procedimientos de conjugación descritos en el ejemplo 4 en un modelo de ratón Balb/c.

Figura 4. Evaluación de la inmunogenicidad de PS06B-CRM conjugado utilizando los procedimientos de conjugación descritos en el ejemplo 4 en un modelo de conejillo de indias.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un procedimiento mejorado para conjugar un antígeno con una proteína transportadora. En particular, la invención proporciona un procedimiento para conjugar un sacárido o sacáridos bacterianos que comprende las etapas

- a) hacer reaccionar el sacárido bacteriano con 0,001-0,7 equivalentes molares de peryodato para formar un sacárido bacteriano activado;
- b) mezclar el sacárido bacteriano activado con una proteína transportadora;
- c) hacer reaccionar el sacárido bacteriano activado y la proteína transportadora con un agente reductor para formar un conjugado;
- o
- a) hacer reaccionar el sacárido bacteriano con 0,001-0,7 equivalentes molares de peryodato para formar un sacárido bacteriano activado;
- b) mezclar el sacárido bacteriano activado con un enlazador;
- c) hacer reaccionar el sacárido bacteriano activado con el enlazador utilizando un agente reductor para formar un sacárido bacteriano-enlazador;
- d) hacer reaccionar el sacárido bacteriano-enlazador con una proteína transportadora para formar un conjugado,

en el que la etapa a) se produce en un tampón que no contiene un grupo amino y el tampón tiene una concentración de entre 1-100 mM.

El término "peryodato" incluye tanto el peryodato como el ácido peryódico. Este término también incluye tanto el metaperyodato (IO_4^-) como el ortoperyodato (IO_6^{5-}), sin embargo en una realización particular, el peryodato utilizado en el procedimiento de la invención es metaperyodato. El término "peryodato" también incluye las diversas sales de peryodato incluyendo el peryodato de sodio y el peryodato de potasio. En una realización el peryodato utilizado es metaperyodato de sodio. Cuando un antígeno reacciona con peryodato, el peryodato oxida los grupos hidroxilo vecinales para formar grupos carbonilo o aldehído y provoca la escisión de un enlace C-C. Por esta razón la expresión "hacer reaccionar un antígeno con peryodato" incluye la oxidación de los grupos hidroxilo vecinales mediante peryodato.

Para los fines de la invención un "sacárido bacteriano activado" es un sacárido bacteriano que se ha activado mediante la etapa a) del proceso de la invención.

Para los fines de la invención, el término "conjugado" indica un sacárido bacteriano ligado covalentemente a una proteína transportadora. En una realización un sacárido bacteriano está unido directamente a una proteína transportadora. En una segunda realización, un sacárido bacteriano está ligado a una proteína a través de un espaciador/enlazador.

El tampón utilizado en la etapa a) es un tampón que no contiene un grupo amino. En una realización el tampón se selecciona entre la lista que consiste en tampón fosfato, tampón borato, tampón acetato, tampón carbonato, tampón maleato y el tampón citrato. En una segunda realización, el tampón es un tampón inorgánico. La expresión "tampón inorgánico" incluye cualquier solución tampón en la que la capacidad de amortiguación del pH se debe a la presencia de un compuesto que no contiene carbono. Los tampones inorgánicos de la invención incluyen el tampón fosfato y el tampón borato. En una realización el tampón es el tampón fosfato.

En una realización el tampón tiene una concentración de entre 1-100 mM, 5-80 mM, 1-50 mM, 1-25 mM, 10-40 mM, 1-10 mM, 5-15 mM, 8-12 mM, 10-20 mM, 5-20 mM, 10-50 mM, aproximadamente 10 mM o aproximadamente 20 mM. En una realización adicional el pH en la etapa a) es pH 2,5-8,0, pH 5,0-7,0, pH 5,5-6,5, pH 5,8-6,3 o aproximadamente pH 6,0.

El término "sacárido" a lo largo de esta memoria descriptiva puede indicar polisacárido, ácido teicoico u oligosacárido e incluye los tres. Puede indicar lipopolisacárido (LPS) o lipooligosacárido (LOS). Antes de su uso los polisacáridos pueden aislarse a partir de una cepa de origen o aislarse de la cepa de origen y dimensionarse en cierto grado por procedimientos conocidos (véanse por ejemplo los documentos EP497524 y EP497525; Shousun Chen Szu y col. -

Carbohydrate Research Vol. 152, págs. 7 - 20 (1986)) por ejemplo por microfluidificación. Los oligosacáridos tienen un bajo número de unidades de repetición (típicamente 5-30 unidades de repetición) y normalmente son polisacáridos hidrolizados.

En una realización el sacárido bacteriano es un sacárido capsular bacteriano. En una realización de la presente invención, el sacárido bacteriano se origina a partir de *Streptococcus* del grupo B, *Vibrio cholera*, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), enterococos, *Salmonella* Vi o *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). En una realización adicional el sacárido bacteriano se origina a partir de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. aureus*, enterococos, *Salmonella* Vi o *S. epidermidis*. En una realización adicional más el sacárido bacteriano es un sacárido capsular bacteriano seleccionado entre una lista que consiste en: *N. meningitidis* serogrupo A (MenA), B (MenB), C (MenC), W135 (MenW) o Y (MenY), *Streptococcus* del grupo B Ia, Ib, II, III, IV, V, VI o VII, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella typhi* (sacárido Vi), *Vibrio cholerae*, o *H. influenzae* tipo b. En una realización el sacárido bacteriano es un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F. En una realización adicional más el sacárido bacteriano es un sacárido capsular de *S. pneumoniae* seleccionado entre el grupo que consiste en 5, 6B, 6A, 7F, 9V, 14 o 23F. Opcionalmente, el sacárido bacteriano de la invención es un sacárido capsular de *S. pneumoniae* 23F, 6B o 6A. En una realización el sacárido bacteriano es un sacárido capsular de *S. pneumoniae* 23F. En una realización el sacárido bacteriano es un sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6B. En una realización el sacárido bacteriano es un sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6A. En una realización adicional más el sacárido bacteriano es un polisacárido u oligosacárido de *Haemophilus influenzae* b (Hib). En una realización el sacárido bacteriano contiene anti díoles vecinales.

El sacárido bacteriano puede o ser un polisacárido nativo, o puede haber sido reducido de tamaño por un factor de no más de x2, x4, x6, x8, x10 o x20 (por ejemplo mediante microfluidificación [por ejemplo, mediante un aparato Emulsiflex C-50] u otra técnica conocida [por ejemplo, calor, química, oxidación, procedimientos de sonicación]). En una realización el sacárido bacteriano se microfluidifica antes de la etapa a). Los oligosacáridos podrían haberse reducido de tamaño sustancialmente más [por ejemplo mediante procedimientos de calor, química u oxidación conocidos].

Para los fines de la invención, "polisacárido nativo" se refiere a un sacárido bacteriano que no se ha sometido a un procedimiento cuyo fin es reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido puede quedar ligeramente reducido de tamaño durante los procedimientos normales de purificación. Un sacárido de este tipo todavía es nativo. El polisacárido no se consideraría nativo solamente si el polisacárido se ha sometido a técnicas que reducen un sacárido de tamaño.

El peso molecular promedio en peso de un sacárido bacteriano adecuado para la conjugación mediante el procedimiento de la invención puede ser de entre 20 kDa y 2000 kDa, entre 30 kDa y 1000 kDa, entre 40 kDa y 500 kDa, entre 50 kDa y 400 kDa, entre 75 kDa y 300 kDa o entre 1000 kDa y 2000 kDa. En el caso del sacárido capsular 23F nativo de *S. pneumoniae*, el peso molecular promedio del polisacárido nativo es de entre 750-1500 kDa o 1200-1300 kDa. En el caso del sacárido Hib nativo, el peso molecular promedio del polisacárido nativo es de entre 100 y 250 kDa. El peso molecular o peso molecular promedio de un sacárido en el presente documento se refiere al peso molecular promedio en peso (Mw) del sacárido bacteriano medido antes de la conjugación y se mide mediante MALLS. La técnica MALLS es bien conocida en la técnica. Para un análisis MALLS de sacáridos, pueden utilizarse dos columnas (TSKG6000 y 5000PWxl) en combinación y los sacáridos se eluyen en agua. Los sacáridos se detectan utilizando un detector de dispersión de luz (por ejemplo el Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10 mW a 488 nm) y un refractómetro interferométrico (por ejemplo Wyatt Optilab DSP equipado con una célula P100 y un filtro rojo a 498 nm). Los análisis MALLS pueden realizarse utilizando un TSKGMPwxi y Na/K PO₄ 50°mM, NaCl 200°mM a pH 7,0 como tampón de elución a 0,75 ml/min utilizando un detector RI/DAWN-EOS. En una forma de realización, la polidispersidad del sacárido es de 1-1,5, 1-1,3, 1-1,2, 1-1,1 o 1-1,05 y después de la conjugación con una proteína transportadora, la polidispersidad del conjugado es de 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5, 1,0-1,2, 1,5-2,5, 1,7-2,2 o 1,5-2,0. Todas las medidas de polidispersidad se generan mediante MALLS.

El tratamiento con peryodato puede conducir a una reducción de tamaño del sacárido bacteriano (efecto de dimensionado). En una realización el procedimiento de la invención reduce este efecto de dimensionado. Esto se observa para el sacárido bacteriano 23F de *Streptococcus pneumoniae* (como en el ejemplo 1). Por esta razón, en una realización el peso molecular promedio de un sacárido bacteriano de la invención es de entre 1-1100 kDa, 100-470 kDa, 200-300 kDa, 600-1100 kDa u 800-1000 kDa después de la etapa a) (medido mediante MALLS como se ha descrito anteriormente). En una realización el peso molecular promedio del sacárido 23F es de entre 100-470 kDa o 200-300 kDa después de la etapa a). En una realización el peso molecular promedio del sacárido bacteriano Hib es de entre 1 y 50 kDa o de entre 5 y 10 kDa después de la etapa a).

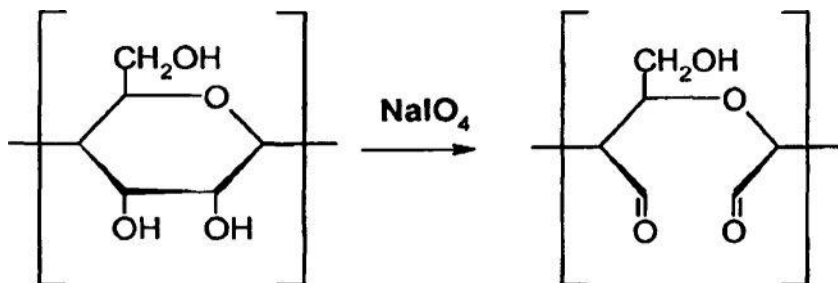
La expresión "proteína transportadora" pretende abarcar tanto los péptidos pequeños como los polipéptidos grandes (> 10 kDa). La proteína transportadora puede ser cualquier péptido o proteína. Puede comprender uno o más epítopos de linfocitos T cooperadores. La proteína transportadora puede ser el toxoide tetánico (TT), el fragmento C del toxoide tetánico, los mutantes no tóxicos de la toxina tetánica [nótese que todas esas variantes de TT se considera que son el mismo tipo de proteína transportadora para los fines de esta invención], polipéptidos que

comprenden epítomos de linfocitos T de la toxina tetánica tales como N19 (documento WO2006/067632), toxoide diftérico (DT), CRM197, otros mutantes no tóxicos de la toxina diftérica [tales como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida y col. *J. Biol. Chem.* 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en *Genetically Engineered Toxins*, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delección o mutación de Glu 148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones desveladas en el documento US 4709017 o US 4950740; mutación de al menos uno o más residuos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones desveladas en el documento US 5917017 o US 6455673; o un fragmento desvelado en el documento US 5843711] (nótese que todas estas variantes de DT se considera que son el mismo tipo de proteína transportadora a los efectos de esta invención), neumolisina neumocócica (Kuo y col. (1995) *Infect Immun* 63; 2706-13), OMPC (proteína de membrana externa meningocócica - generalmente extraída de *N. meningitidis* del serogrupo B - documento EP0372501), péptidos sintéticos (documento EP0378881, documento EP0427347), proteínas de choque térmico (documento WO 93/17712, documento WO 94/03208), proteínas pertúxicas (documento WO 98/58668, documento EP0471177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31; 3816-3824), tales como proteína N19 (Baraldoi y col. (2004) *Infect Immun* 72; 4884-7), proteína de superficie neumocócica PspA (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), la toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761), Proteína D de *H. influenzae* (documentos EP594610 y WO 00/56360), PhtA neumocócica (documento WO 98/18930, también denominada Sp36), PhtD neumocócica (desvelada en el documento WO 00/37105 y también se denomina Sp036D), PhtB neumocócica (desvelada en el documento WO 00/37105 y también se denomina Sp036B) o PhtE (desvelada en el documento WO00/30299 y se denomina como BVH-3).

En una realización de la invención, la proteína transportadora se selecciona entre el grupo que consiste en: toxoide tetánico (TT), fragmento C del toxoide tetánico, toxoide diftérico (DT), CRM197, neumolisina (Ply), proteína D, PhtD, PhtDE y N19. En una realización adicional la proteína transportadora es CRM197. En otra realización adicional más, la proteína transportadora es el toxoide tetánico (TT).

En una realización la etapa a) se realiza en la oscuridad.

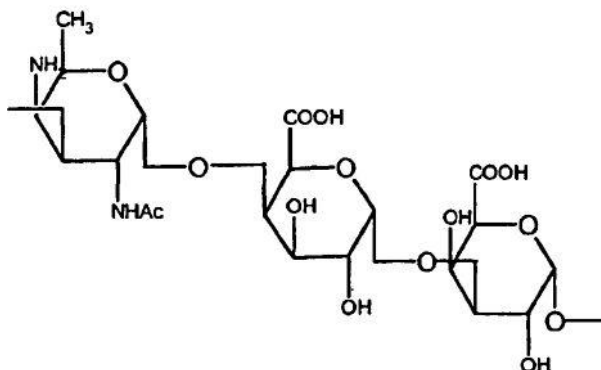
Cuando un antígeno reacciona con peryodato, el peryodato oxida los grupos hidroxilo vecinales para formar grupos carbonilo o aldehído y provoca la escisión de un enlace C-C. La etapa de oxidación (etapa a)) puede producirse como se describe a continuación:



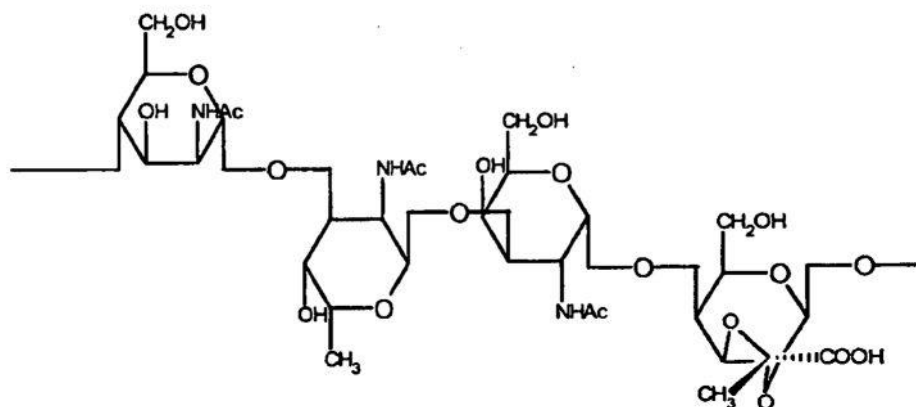
Cuando se utilizan bajas concentraciones de tampón, en particular de tampón fosfato, y bajas cantidades de peryodato, esto puede reducir el efecto de dimensionado descrito anteriormente.

Los sacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* contienen grupos hidroxilo vecinales, que son susceptibles de ser oxidados mediante peryodato como puede observarse a partir de las estructuras de las regiones repetidas mostradas a continuación:

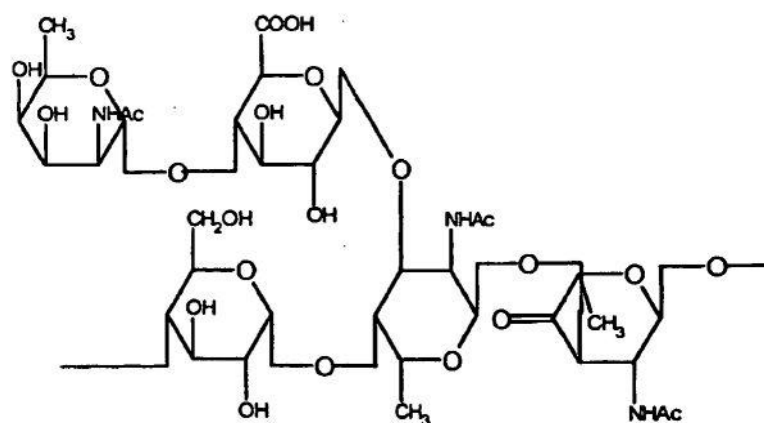
PS1



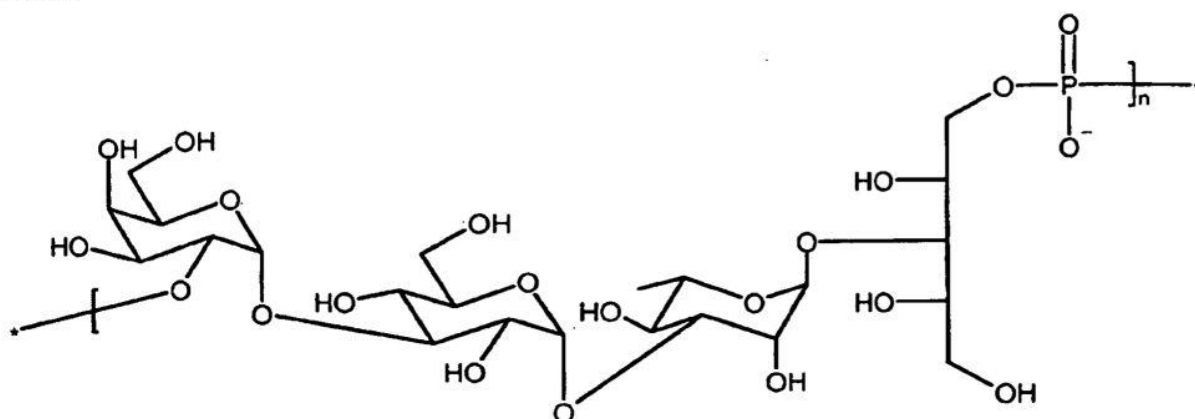
PS4



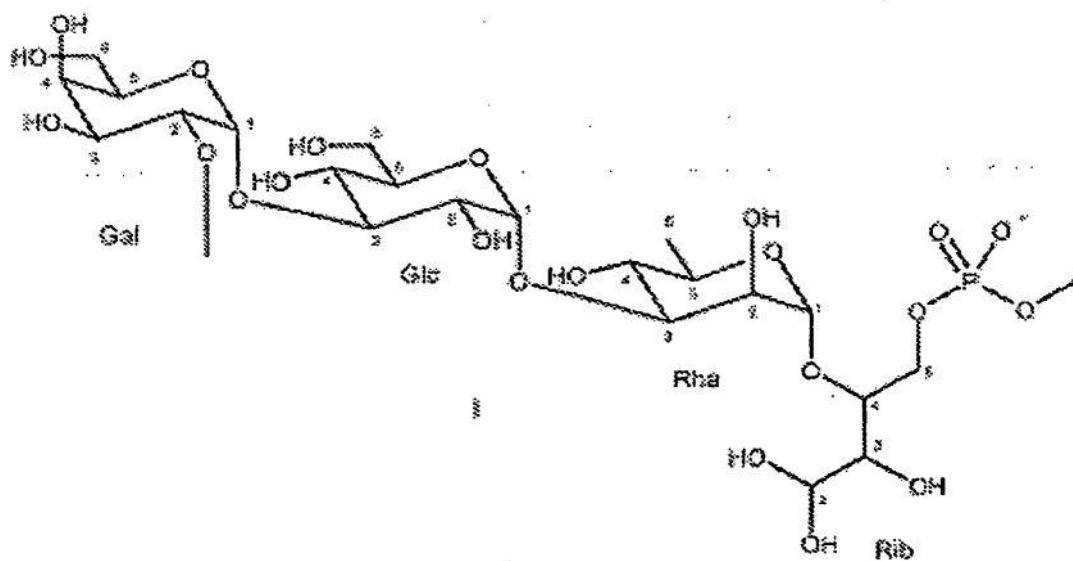
PS5



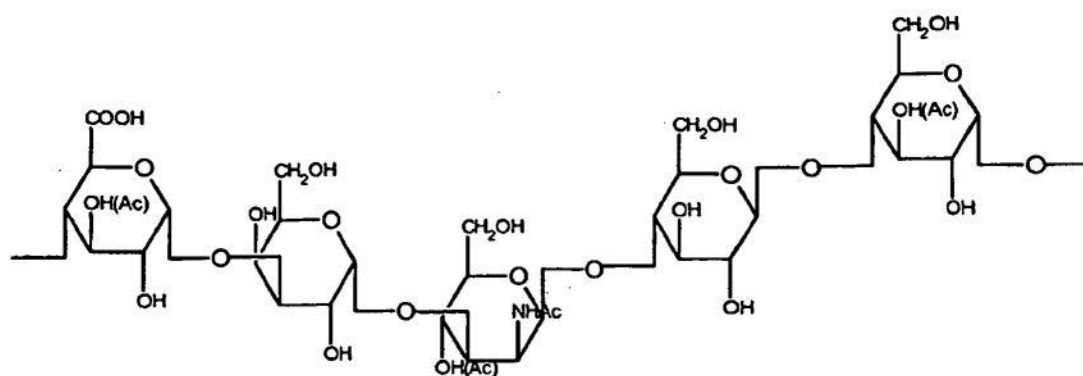
PS 6A



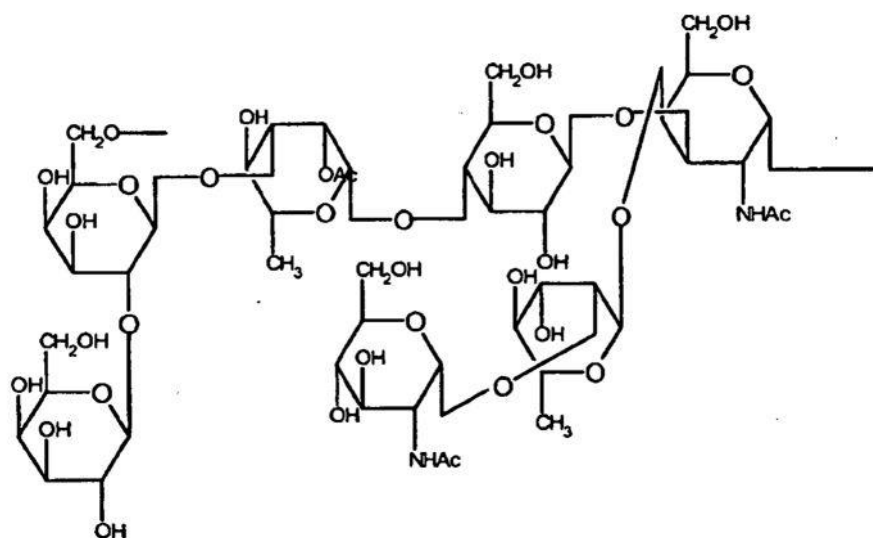
PS 6B



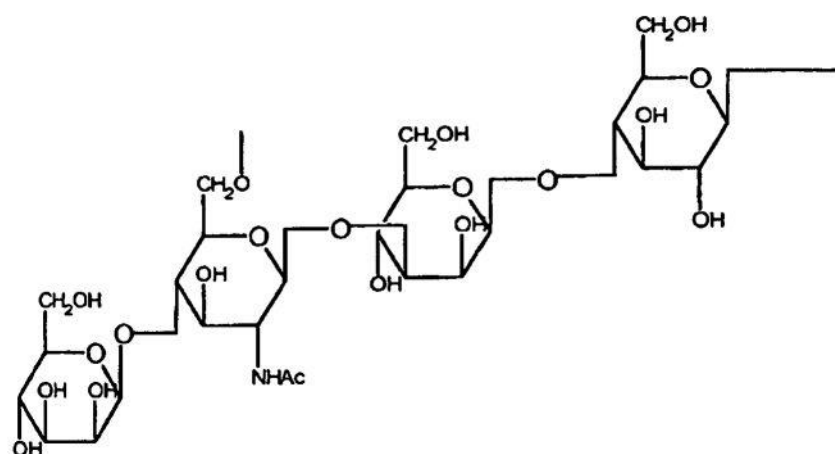
PS9



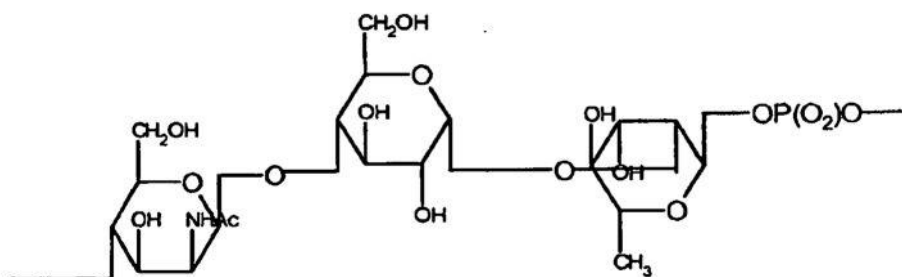
PS7F



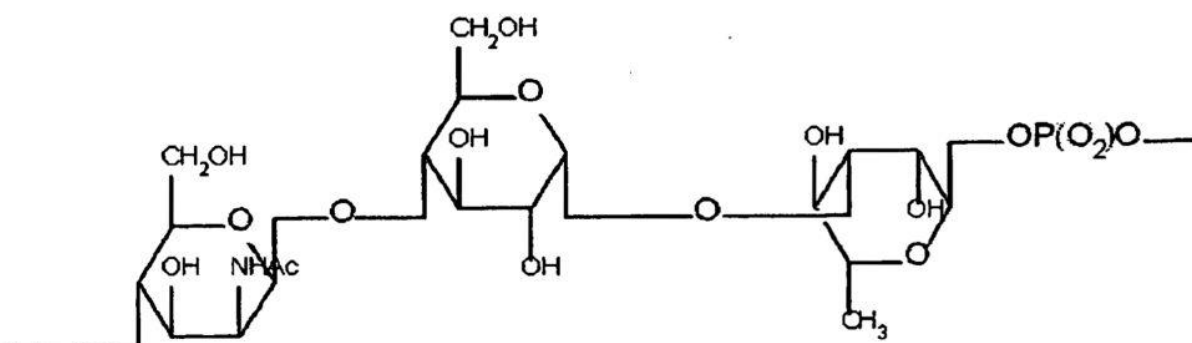
PS14

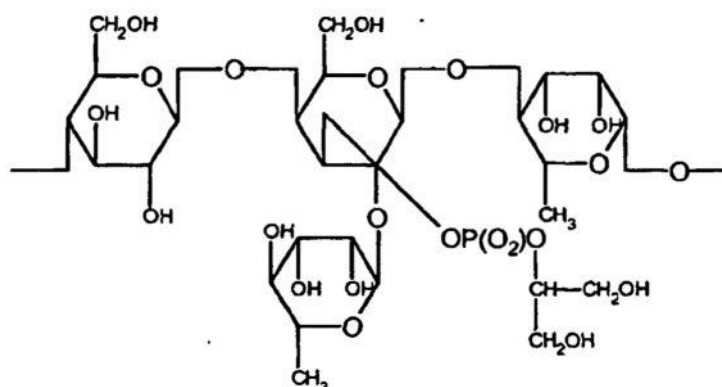
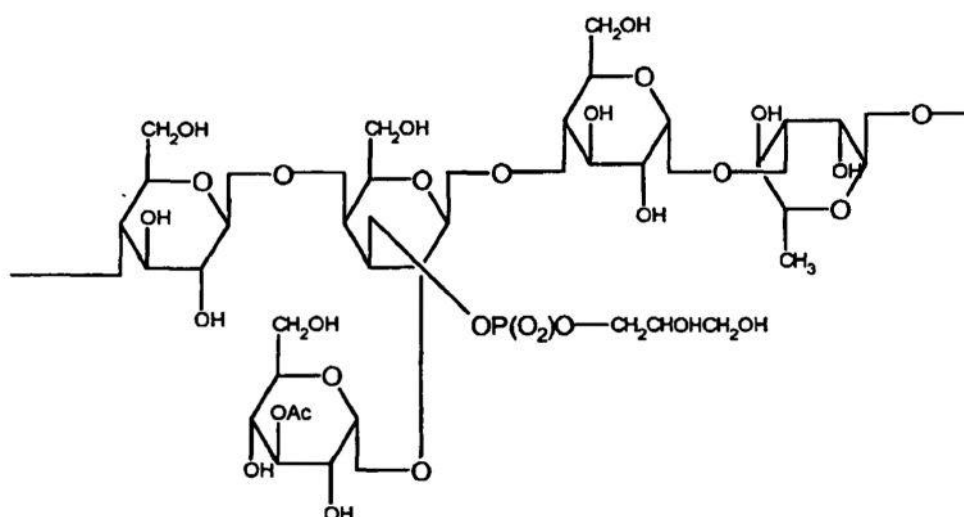


PS19F



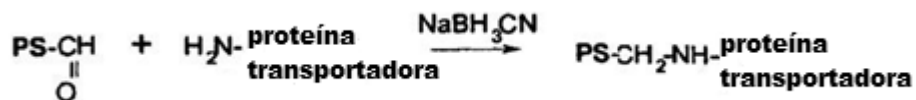
PS19A



PS23F**PS18C**

En una realización menos del 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 30 % o 50 % de los dioles vecinales del sacárido bacteriano se vuelven oxidados durante la etapa a).

- 5 En una realización el grupo carbonilo producido en la etapa a) reacciona con un grupo amino de la proteína transportadora en la etapa c). Esto puede ocurrir según el siguiente esquema de reacción:



- 10 En una realización el sacárido bacteriano está presente en una concentración de entre 0,2 g/l y 14 g/l, 8 g/l y 12 g/l, 10 g/l y 12 g/l, 1 g/l y 4 g/l, 0,2 g/l y 1 g/l o entre 0,4 g/l y 0,6 g/l o aproximadamente 11 g/l o aproximadamente 0,5 g/l en la etapa a). En una realización la concentración inicial de proteína transportadora en la etapa b) es de entre 0,5 g/l y 35 g/l, 25 g/l y 35 g/l, 0,5 g/l y 5 g/l o entre 0,8 g/l y 2 g/l o aproximadamente 32 g/l o 1 g/l. En una realización adicional, la concentración inicial de sacárido bacteriano activado en la etapa b) es de entre 0,2 g/l y 20 g/l, 10 g/l y 28 g/l o 0,2 g/l y 4 g/l o entre 1 g/l y 2 g/l o aproximadamente 15 g/l o 1,6 g/l. En una realización adicional, la relación inicial entre el sacárido bacteriano activado y la proteína transportadora en la etapa b) es de 2,0:1 a 0,1:1, 1,8:1 a 0,4:1, 1,4:1 a 1,6:1, 1:1 a 1,4:1, 1,8:1 a 1,6:1, 0,8:1 a 0,4:1, 0,7:1 a 0,5:1 o 0,7:1 a 0,6:1 (p/p). En una realización adicional, la relación final entre la proteína transportadora y el sacárido bacteriano después de la etapa c) o c') es de 0,5:1 a 4:1, 0,8:1 a 3,2:1, 0,5:1 a 1,8:1, 1,4:1 a 1,8:1, 1:1 a 1,2:1 o 2,5:1 a 3,5:1.
- 15

En una realización la temperatura de la reacción en la etapa a) es de 4-40°C, 10-32°C, 17-30°C o 22-27°C. Típicamente se mantiene esta temperatura a través de la etapa a). La temperatura de reacción durante la etapa c) es de 4-40°C, 10-32°C, 17-30°C o 22-27°C. Típicamente se mantiene esta temperatura a través de la etapa c).

- 5 En una realización la etapa a) del procedimiento de la invención se produce en menos de 30 horas, entre 5 y 25 horas, entre 15 y 25 horas, entre 30 minutos y 25 horas, entre 1 hora y 35 horas, de 10 a 20 horas o entre 15 y 20 horas aproximadamente 18 horas o aproximadamente 1 hora. En una realización la etapa c) del procedimiento de la invención se produce en entre 10-60 horas, 10-20 horas, 20-60 horas, entre 30-50 horas o entre 35-45 horas.

- 10 La conjugación puede también ocurrir a través de la adición de un enlazador o hetero u homobifuncional utilizando la química de la invención. Un extremo del enlazador reaccionará con el antígeno activado mediante aminación reductora, sin embargo el otro extremo del enlazador puede reaccionar con la proteína transportadora utilizando cualquier tipo de química. Por esta razón, el enlazador contendrá al menos un grupo amino reactivo, si el enlazador es homobifuncional contendrá dos grupos amino reactivos, si el enlazador es heterobifuncional contendrá un grupo amino reactivo y un grupo reactivo diferente, en una realización este segundo grupo reactivo es un grupo carbonilo reactivo. En una realización el enlazador tiene entre 1 y 20 Angstroms de longitud. En una realización adicional, el enlazador tiene entre 4 y 20, 4 y 12 o 5 y 10 átomos de carbono. Un posible enlazador es la dihidrazida de ácido adipico (ADH). Otros enlazadores incluyen B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofeniletilamina (Gever y col. (1979) *Med Microbiol Immunol* 165; 171-288), haluros de haloalquilo (documento US4057685), enlaces glicosídicos (documento US4673574, documento US4808700), hexanodiamina y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286).

- 20 En general, los siguientes tipos de grupos químicos de la proteína transportadora pueden utilizarse para el acoplamiento/conjugación como segundo grupo reactivo:

- 25 A) Un carboxilo (por ejemplo a través del ácido aspártico o del ácido glutámico). En una realización este grupo se une a un grupo amino por un enlazador de química carbodiimida por ejemplo, con EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)). Nota: En lugar del EDAC mencionado anteriormente, puede utilizarse cualquier carbodiimida adecuada.

- B) Un grupo amino (por ejemplo a través de la lisina). En una realización este grupo está unido a un grupo carboxilo por un enlazador de química carbodiimida por ejemplo, con EDAC. En otra realización este grupo se une a grupos hidroxilo activados con CDAP o CNBr por un enlazador; a enlazadores que tienen un grupo aldehído; a enlazadores que tienen un grupo éster de succinimida.

- 30 C) Un sulfhidrilo (por ejemplo a través de la cisteína). En una realización este grupo está unido a un enlazador acetilado de bromo o cloro de química maleimida. En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobencidina.

- D) La proteína podría modificarse para contener un grupo alquínico o azido, éste podría conjugarse con el enlazador utilizando la química "clic" (descrito en *Tetrahedron letters* (junio de 2005) 46: 4479-4482).
- 35 Nota: en lugar del EDAC mencionado anteriormente, puede utilizarse cualquier carbodiimida adecuada.

- Los agentes reductores que son adecuados para su uso en el procedimiento de la invención incluyen los cianoborohidruros, tales como cianoborohidruro de sodio, boranopiridina o resina de intercambio de borohidruro. En una realización el agente reductor es cianoborohidruro de sodio. En una realización se utilizan entre 0,5 y 2, 0,6 y 1,5 o 0,8 y 1,2 o aproximadamente 1,0 equivalente molar de cianoborohidruro de sodio en la etapa c). En una realización adicional, el agente reductor comprende triacetoxiborohidruro de sodio, en una realización adicional se utilizan entre 2 y 10 o entre 3 y 9 equivalentes molares o aproximadamente 2,5 equivalentes molares de triacetoxiborohidruro de sodio en la etapa c).
- 40

- Antes de la etapa c) el sacárido bacteriano activado y la proteína transportadora pueden liofilizarse. En una realización el sacárido bacteriano activado y la proteína transportadora se liofilizaron juntos. Esto puede ocurrir antes de la etapa b) o después de la etapa b). En una realización la liofilización se realiza en presencia de un azúcar no reductor, los posibles azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melicitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una realización adicional el azúcar no reductor se selecciona entre el grupo que consiste en sacarosa, trehalosa o manitol.
- 45

- En una realización las etapas b) y/o c) se realizan en el disolvente DMSO (dimetilsulfóxido). En una realización adicional las etapas b) y/o c) se realizan en el disolvente DMF (dimetilformamida). El disolvente DMSO o DMF puede utilizarse para reconstituir el sacárido bacteriano activado y la proteína transportadora que se han liofilizado.
- 50

- Al final de la etapa c) pueden permanecer grupos carbonilo sin reaccionar en los conjugados, estos pueden protegerse usando un agente de protección terminal adecuado. En una realización este agente de protección terminal es borohidruro de sodio (NaBH_4), por ejemplo, el producto de la etapa c) puede hacerse reaccionar con borohidruro de sodio durante 15 minutos-15 horas, 15 minutos-45 minutos, 2-10 horas o 3-5 horas, aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 4 horas. En una realización adicional la protección terminal se consigue mediante la mezcla del producto de la etapa c) con aproximadamente 2 equivalentes molares o entre 1,5 y 10 equivalentes
- 55

molares de NaBH₄.

La invención también proporciona una etapa adicional e) de purificación del conjugado, la etapa e) puede comprender diafiltración, por ejemplo diafiltración con un límite de 100 kDa. Además o como alternativa la etapa e) puede comprender la cromatografía de intercambio de iones. En una realización adicional la etapa e) puede comprender la cromatografía de exclusión de tamaño. En una realización el procedimiento de las reivindicaciones 1-51 comprende una etapa adicional f), en donde el conjugado se filtra para esterilizar.

El conjugado también puede mezclarse con antígenos adicionales. En una realización los antígenos adicionales comprenden al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sacáridos de *S. pneumoniae* seleccionados entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C y 19F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 4, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae*, 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C y 19F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 19F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 19F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A y 19F. En una realización los antígenos adicionales comprenden los sacáridos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

Cualquiera de los sacáridos enumerados como "antígenos adicionales" están conjugados opcionalmente con una proteína transportadora ya sea mediante el procedimiento de la invención o mediante un procedimiento diferente. Opcionalmente estos antígenos adicionales se conjugan con las proteínas transportadoras enumeradas anteriormente.

En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 1 de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular 3 de *S. pneumoniae* conjugado con la proteína D, CRM197, neumolisina o PhtD o un fragmento o proteína de fusión de la misma. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 4 conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 5 conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6B conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 7F conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 9V conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 14 conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 23F conjugado con la proteína D o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 18C conjugado con el toxoide tetánico o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 19A conjugado con neumolisina o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 22F conjugado con CRM197 o PhtD o un fragmento de la proteína de fusión de la misma. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6A conjugado con neumolisina o una proteína de *H. influenzae*, opcionalmente proteína D o PhtD o proteína de fusión de la misma o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 6C conjugado con neumolisina o una proteína de *H. influenzae*, opcionalmente la proteína D o PhtD o proteína de fusión de la misma o CRM197. En una realización, los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular de *S. pneumoniae* 19F conjugado con toxoide diférico (DT).

Los antígenos adicionales también pueden comprender proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. En una realización los antígenos adicionales comprenden al menos 1 proteína seleccionada entre el grupo que consiste en la familia de poli-histidina en triada (PhtX), la familia de proteínas de unión a la colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) de truncado de CbpX-truncado de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y SP133.

Los antígenos adicionales también pueden comprender antígenos de especies bacterianas adicionales. En una realización la vacuna o composición inmunogénica comprende antígenos procedentes de *S. pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* (*H. Influenzae*), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *Escherichia coli* (*E.coli*), *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*), el tétanos, la difteria, la tosferina, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), enterococos, *Pseudomonas* o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

En una realización los antígenos adicionales comprenden antígenos de *M. cattarhalis*, los antígenos preferidos de *M. cattarhalis* son: OMP106 [documentos WO 97/41731 (Antex) y WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA y LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y TbpB [documentos WO 97/13785 y WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, y col. (1993) *Infect. Immun.* 61: 2003-2010]; UspA1/2 [documento WO 93/03761 (Universidad de Texas)]; y OmpCD. Los ejemplos de antígenos no tipificables de *Haemophilus influenzae* que pueden incluirse en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) incluyen: proteína fimbrina [(documento US 5766608-Fundación de Investigación Estatal de Ohio)] y fusiones que comprenden péptidos de la misma [por ejemplo LB1 (f) fusiones de péptidos; documento US 5843464 (OSU) o documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (Universidad Estatal de Nueva York)]; TbpA y TbpB; Hia; Hmw1,2; Hap; y D15.

En una realización adicional, los antígenos adicionales comprenden el toxoide diftérico (DT), el toxoide tetánico (TT) y componentes pertúsicos [típicamente el toxoide pertúsico destoxificado (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) con pertactina opcional (PRN) y/o aglutinina 1+2], por ejemplo la vacuna comercializada INFANRIX-DTPaTM (SmithKlineBeecham Biologicals) que contiene antígenos DT, TT, PT, FHA y PRN o con un componente pertúsico de célula completa como por ejemplo el comercializado por SmithKlineBeecham Biologicals s.a., como TritanrixTM. En una realización adicional los antígenos adicionales comprenden el antígeno de superficie de Hepatitis B (HepB).

En una realización adicional los antígenos adicionales comprenden el sacárido capsular PRP de *H. influenzae* (Hib).

En una realización adicional los antígenos adicionales comprenden al menos un sacárido capsular de *N. meningitidis* A, C, W o Y. En una realización adicional los antígenos adicionales comprenden al menos un conjugado de un sacárido capsular de *N. meningitidis* A, C, W o Y.

El conjugado también puede mezclarse con un adyuvante. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), monofosforil lípido A (por ejemplo 3D-MPL), saponinas (por ejemplo QS21), emulsiones de aceite en agua, ampollas o preparaciones de vesículas de membrana externa de cepas bacterianas gramnegativas (tales como aquellas enseñadas por el documento WO 02/09746), lípido A o derivados del mismo, fosfatos de alquilglucosamida o combinaciones de dos o más de estos adyuvantes.

En una realización adicional del conjugado de la invención se mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un conjugado obtenible mediante el procedimiento de la invención. En un aspecto adicional de la invención se proporciona un conjugado obtenido mediante el procedimiento de la invención. La invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende el conjugado de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización el excipiente farmacéuticamente aceptable no contiene una sal de cloruro, en una realización adicional el excipiente farmacéutico no contiene cloruro de sodio. En una realización el excipiente farmacéutico comprende un tampón seleccionado entre el grupo que consiste en maleato, tris o citrato. En una realización adicional, el tampón es tampón maleato.

La composición inmunogénica de la invención puede comprender antígenos adicionales, en particular aquellos descritos como "antígenos adicionales" anteriormente. La composición inmunogénica puede comprender un adyuvante, en particular aquellos descritos anteriormente.

La invención también proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención.

Las preparaciones de vacunas que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden utilizarse para proteger o tratar a un mamífero susceptible a la infección, por medio de la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección por medio de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por medio de la administración en la mucosa de los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. La administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media es posible (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos puede evitarse con más eficacia, atenuando así la infección en su etapa más temprana). Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como una dosis única, los componentes de la misma también pueden coadministrarse juntos al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo los conjugados de sacáridos neumocócicos podrían administrarse por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquier componente proteínico bacteriano de la vacuna para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias la una con respecto a la otra). Además de una vía de administración única, pueden usarse 2 vías diferentes de administración. Por ejemplo, los sacáridos o conjugados de sacáridos pueden administrarse por vía IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden administrarse por vía IN (o ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse por vía IM para las dosis primovacuna y por vía IN para las dosis de refuerzo.

El contenido de antígenos proteínicos en la vacuna estará típicamente en el intervalo de 1-100 µg, opcionalmente 5-50 µg, más típicamente en el intervalo de 5-25 µg. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

La preparación de la vacuna se describe en general en *Vaccine Design* ("The subunit and adjuvant approach" (ed. Powell MF y Newman MJ) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación con liposomas está descrita por Fullerton, patente de los EE.UU. 4.235.877.

Aunque las vacunas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) conforma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula externa "córnea", llamada el estrato córneo, que se superpone a la epidermis. Debajo de esta epidermis hay una capa llamada la dermis, que a su vez se superpone al tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna en la piel y en particular en la dermis, estimula una respuesta inmunitaria, que también puede asociarse a una serie de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en el presente documento conforma una característica opcional de la presente invención.

La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento de Mantoux", comprende las etapas de limpiar la piel, y después estirando con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) mirando hacia arriba se inserta la aguja en un ángulo de entre 10-15 °. Una vez que se inserta el bisel de la aguja, el cilindro de la jeringuilla se baja y se empuja más mientras que se proporciona una ligera presión para elevarla bajo la piel. El líquido se inyecta muy lentamente formando de esta manera una vesícula o protuberancia en la superficie de la piel, seguido de la retirada lenta de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos que están específicamente diseñados para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección comprimida descritos por ejemplo en los documentos WO 01/13977; US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639, US 4.596.556, Estados Unidos 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los procedimientos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de la vacuna pueden incluir jeringuillas y agujas convencionales o dispositivos diseñados para la administración balística de vacunas sólidas (documento WO 99/27961) o parches transdérmicos (documento WO 97/48440; documento WO 98/28037); o aplicado a la superficie de la piel (administración transdérmica o transcutánea documento WO 98/20734; documento WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención son para administrarse en la piel o más específicamente en la dermis, la vacuna está en un volumen de líquido bajo, en particular un volumen de entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

El contenido de antígenos en las vacunas cutáneas o intradérmicas de la presente invención puede ser similar a las dosis convencionales que se encuentran en las vacunas intramusculares (véase anteriormente). Sin embargo, es una característica de las vacunas cutáneas o intradérmicas que las formulaciones pueden ser de "dosis baja". En consecuencia, los antígenos proteínicos en las vacunas de "dosis baja" están opcionalmente presentes en tan poca cantidad como de 0,1 a 10 µg o 0,1 a 5 µg por dosis; y los antígenos del sacárido (opcionalmente conjugado) pueden estar presentes en el intervalo de 0,01-1 µg o entre 0,01 a 0,5 µg de sacárido por dosis.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "administración intradérmica" significa la administración de la vacuna en la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no necesariamente se localizará exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa de la piel localizada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0°mm desde la superficie de la piel humana, pero existe una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, puede esperarse alcanzar la dermis yendo 1,5°mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis se localiza entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea debajo. Dependiendo del modo de administración, la vacuna puede, en última instancia, estar localizada exclusiva o principalmente dentro de la dermis o puede, en última instancia, estar distribuida dentro de la epidermis y la dermis.

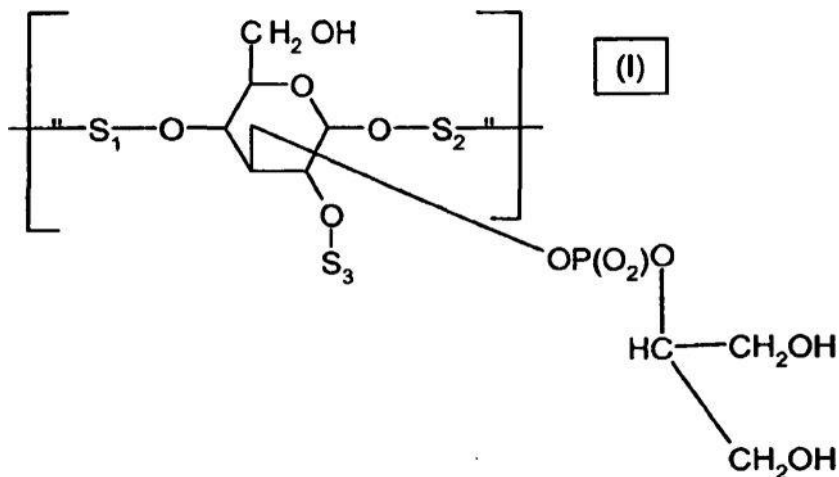
En un aspecto de la invención se proporciona un kit de vacuna, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada y que comprende adicionalmente un vial que contiene un adyuvante como se describe en el presente documento. Se prevé que en este aspecto de la invención, el adyuvante se utilizará para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento de inmunización de un hospedador humano contra la infección por enfermedad bacteriana que comprende la administración al hospedador de una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención. Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento de inmunización de un hospedador humano contra la infección causada por *S. pneumoniae* y/o *Haemophilus influenzae* que comprende la administración al hospedador de una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención.

Un aspecto adicional de la invención es una composición inmunogénica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad bacteriana. Un aspecto adicional de la invención es una composición inmunogénica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad causada por *S. pneumoniae* y/o la infección por *Haemophilus influenzae*.

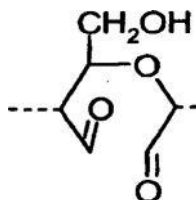
Un aspecto adicional de la invención es el uso de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades bacterianas. Un aspecto adicional de la invención es el uso de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por *S. pneumoniae* y/o la infección por *Haemophilus influenzae*.

La invención también proporciona un sacárido bacteriano activado, en el que el sacárido bacteriano activado comprende una unidad de repetición de fórmula (I):

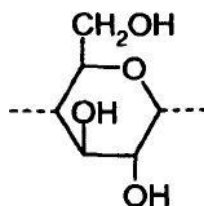


en la que el sacárido bacteriano activado comprende n unidades de repetición y n está entre 2 y 2400, entre 500 y 2000, entre 750 y 1500, entre 1000 y 2000 o entre 1500 y 2300.

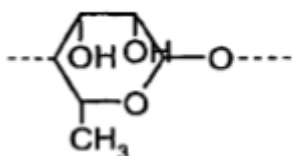
En la que al menos el 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 % o 30 % pero menos del 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 30 % o 50 % de S1 es



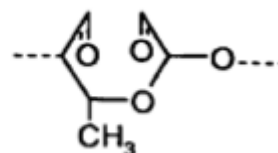
y el resto es



en la que S2 es ya sea



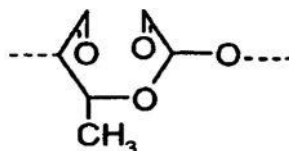
o



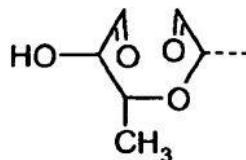
y en la que S3 es ya sea



En una realización menos del 0,001 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 % o 50 % de S2 es



5 En una forma de realización menos del 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 % o 50 % de S3 es



"Alrededor" o "aproximadamente" se definen como dentro del 10 % más o menos de la cifra dada para los fines de la invención.

10 Las expresiones "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento se pretende por los inventores que sean opcionalmente sustituibles por los términos "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en todos los casos.

Las realizaciones en el presente documento referidas a "composiciones de la vacuna" de la invención también son aplicables a realizaciones referidas a "composiciones inmunogénicas" de la invención, y viceversa.

15 Todas las referencias o solicitudes de patentes citadas en esta memoria descriptiva de patente se incorporan por referencia en el presente documento.

Con el fin de que esta invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son para fines de ejemplificación solamente y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

20 Ejemplo 1 – Oxidación de 23F y 6B utilizando peryodato

25 Se disolvieron los polisacáridos (PS) 23F o 6B en KH₂PO₄ (pH 7,4) 100 mM, KH₂PO₄ 10 mM o WFI, para formar soluciones de 2 mg de PS/ml. La solución se incubó durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. Después de este tiempo el pH se ajustó a pH 6,0 con HCl 1N. Se añadió peryodato como un polvo o en forma líquida (10 mg/ml en WFI) en diversas cantidades para conseguir un intervalo de relaciones molares (tabla I). Las soluciones se incubaron durante 17 horas a temperatura ambiente (20-25°C), después de este tiempo las muestras se dializaron o diafiltraron frente a WFI.

30 Se utilizó cromatografía de filtración en gel de alta eficacia junto con detectores de índice de refracción y de dispersión de luces láser multiángulo (MALLS) para medir el peso molecular. Se utilizaron medios de exclusión por tamaño (TSK5000PWXL-Tosoh) para el perfil de distribución del tamaño molecular del polisacárido (elusión a 0,5 ml/min en NaCl 0,2 M-Na₃N al 0,02 %).

La tabla 1 y la figura1 describen los resultados de estos experimentos. Estos demuestran que para el sacárido 23F se produce un dimensionamiento sustancial en la oxidación utilizando equivalentes molares altos de peryodato en tampón fosfato 100 mM. Este efecto de dimensionado puede reducirse mediante la reducción de la concentración de tampón fosfato o los equivalentes molares de peryodato utilizado.

35

Tabla 1:

23F				6B			
Muestra	Equivalente molar de peryodato	Tampón	Tamaño (KDa)	Muestra	Equivalente molar de peryodato	Tampón	Tamaño (KDa)
23F nativo	0	Agua	861	6B	0	Fosfato 10 mM	1022
23F nativo	0	Fosfato 10 mM	847	6B	0,1	Fosfato 10 mM	975
23F nativo	0	Fosfato 100 mM	860	6B	0,2	Fosfato 10 mM	990
23F ATCC nativo	0	Fosfato 100 mM	1655	6B	0,3	Fosfato 10 mM	961
23F	1	Fosfato 100 mM	<1	6B	0,75	Fosfato 10 mM	868
23F	1	Agua	36				
23F	1,2	Fosfato 100 mM	<1				
23F ATCC	1	Fosfato 100 mM	2				
23F ATCC	0,125	Fosfato 100 mM	39				
23F	0,1	Fosfato 10 mM	466,9				
23F	0,15	Fosfato 10 mM	398,5				
23F	0,2	Fosfato 10 mM	336				
23F	0,5	Fosfato 10 mM	179,1				

Ejemplo 2 - conjugación de 23F con CRM197 utilizando aminación reductora y química CDAPAminación reductora

- 5 Se disolvió 1 g de PS23F en 500 ml de KH_2PO_4 10°mM, pH 7,15. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante dos horas. El pH se ajustó a 6,0 con HCl con 1 M. Se añadieron 111 mg de peryodato (NaIO_4 , 0,4 equivalentes molares de peryodato) a la solución PS23F y la solución se incubó durante 17 horas en la oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el PS23F. Después, la solución se diafiltró frente a WFI.

- 10 El PS23F activado se liofilizó con la proteína CRM197 (en una relación CRM/PS (p/p): 0,625). En presencia de un agente estabilizante.

Se solubilizaron 900 mg de la mezcla liofilizada PS23F/CRM197 mediante la adición de 350 ml de disolvente DMSO y la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente. Para reducir la mezcla de PS23F/CRM197 se añadió 1 equivalente molar de NaBH_3CN (735 μl de una solución de 100 mg/ml en WFI). La solución se incubó durante unas 40 horas más a temperatura ambiente (15°C-25°C) con agitación. Después de este tiempo se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/ml en WFI) y la solución se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añadieron 2200 ml de NaCl 150 mM antes de la diafiltración (límite de 100 kDa) y la purificación por DEAE. Las fracciones de interés se agruparon y se filtraron a través de un filtro de 0,22 μm .

CDAP

Se disolvieron 200 mg de PS23F microfluidificado en agua hasta que se obtuvo una concentración de 10 mg/ml. Se añadió NaCl a esta solución a una concentración final de 2 M.

Se añadió suficiente solución de CDAP (100mg/ml recién preparada en 5/50 v/v de acetonitrilo/WFI) para alcanzar una relación CDAP:PS de 0,75 mg/mg PS.

Después de 90 segundos, el pH se elevó a pH 9,5 mediante la adición de NaOH 0,1 N. 3 minutos más tarde se añadió suficiente CRM197 (10 mg/ml en NaCl 0,15 M) para alcanzar una relación de 1,5. (CRM197:PS (p/p)), se mantuvo el pH a pH 9,5. Esta solución se incubó durante 1 hora a pH 9,5.

Después de esta etapa de acoplamiento, se añadieron 10 ml de solución de glicina 2 M a la mezcla y el pH se ajustó a pH 9,0 (el pH de desactivación). La solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El conjugado se purificó utilizando un filtro de 5 μm seguido de Sephacryl S400HR (XK50/100) que retira las moléculas pequeñas y los polisacáridos no conjugados y las proteínas. El caudal se fijó en 150 ml/hora. La elución se consiguió utilizando 150 mM de NaCl . Las fracciones de interés se agruparon y se filtraron utilizando Milipack 20. El conjugado resultante tenía una relación final de CRM197/PS (p/p) de 1,35/w.

Ejemplo 3 - Inmunogenicidad de conjugados 23F-CRM197 fabricados mediante aminación reductora y química CDAP

Los conjugados se fabricaron utilizando los procedimientos descritos en el ejemplo 2. Se inmunizaron conejillos de indias hembra por vía intramuscular tres veces (en los días 0, 14 y 28) con 0.25 μg de los conjugados PS23F-CRM197. Los animales se sangraron el día 42 y la respuesta de anticuerpos dirigida contra PS23F se midió mediante ELISA y OPA.

ELISA

Las microplacas se recubrieron con polisacárido de neumococo purificado en tampón PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % y Tween 20 al 0,05 %. Los sueros se incubaron durante hora a 37°C con CPS (V/V) en PBS-Tween 20 al 0,05 %. Los sueros se añadieron a los pocillos y se diluyeron en serie (etapa de dilución doble) en PBS-Tween al 0,05 %. Las placas se incubaron con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como anteriormente y se añadió un conjugado de anticuerpos IgG anti-conejo de indias con peroxidasa, las placas después se incubaron durante 30 minutos a TA. Después del lavado, se añadió el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 M pH 4,5 y 5 μl de H_2O_2) a cada pocillo durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N. Se leyó la absorbancia a 490-620 nm utilizando un espectrofotómetro. El color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero. El nivel de IgG anti-PS presente en los sueros se determina mediante comparación con el suero de la curva de referencia añadido en cada placa y se expresa en $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados se analizaron estadísticamente después de asumir la homogeneidad de la varianza (verificada mediante la prueba C de Cochran) y la normalidad (verificada mediante la prueba de Shapiro-Wilk). Todas las estadísticas se realizaron utilizando Anova (Tukey-HSD) sobre la transformación logarítmica de la concentración de IgG.

Opsonofagocitosis

Las muestras de suero se calentaron durante 45 minutos a 56°C para inactivar cualquier complemento endógeno restante. Se diluyeron en serie (doble) alícuotas de veinticinco microlitros de cada muestra de suero diluida 1:2 en 25 μl de tampón OPA (HBSS-FBS inactivado al 14,4 %) por pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo. Posteriormente, se añadieron 25 μl de una mezcla de células activadas HL-60 (1×10^7 células/ml), inóculo neumocócico activo recién descongelado y complemento de conejo bebé recién descongelado en una relación de por ejemplo 4/2/1 (v/v/v) a los sueros diluidos para producir un volumen final de 50 μl . La placa de ensayo se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación orbital (210 rpm) para promover el proceso fagocítico. La reacción se detuvo mediante la colocación de la microplaca en hielo durante al menos 1 minuto. Una alícuota de 20 μl de cada pocillo de la placa se transfirió después al pocillo correspondiente de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano y se añadieron 50 μl de caldo Todd-Hewitt-agar al 0,9 % a cada pocillo. Después de la incubación durante la noche a 37 °C y CO_2 al 5 %, las colonias de neumococos que aparecieron en el agar se contaron utilizando un sistema de análisis de imagen automatizado (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se utilizaron

ocho pocillos sin muestra de suero como controles bacterianos para determinar el número de neumococos por pocillo. El número medio de CFU de los pocillos de control se determinó y se utilizó para el cálculo de la actividad letal para cada muestra de suero. El título de OPA para las muestras de suero se determinó mediante la dilución recíproca de suero capaz de facilitar la destrucción del 50 % de los neumococos. El título opsonofagocítico se calculó mediante el uso de un análisis ajustado a una curva de 4 parámetros.

Los resultados se analizaron estadísticamente después de asumir la homogeneidad de la varianza (verificada por la prueba C de Cochran) y la normalidad (verificada mediante la prueba de Shapiro-Wilk). Todas las estadísticas se realizaron mediante Anova (Tukey-HSD) sobre la transformación logarítmica de la concentración de IgG para ELISA y mediante Kruskal-Wallis sobre la dilución logarítmica para OPA.

Se indujo una respuesta de anticuerpos significativamente mayor en los conejillos de indias después de la inmunización con el PS23F-CRM197 conjugado mediante aminación reductora que con el PS23F-CRM197 conjugado mediante la química CDAP como se ve en la figura 2.

Tabla 2

Ensayo	23F-CRM197 fabricado mediante aminación reductora	23F-CRM197 fabricado mediante CDAP
Título de ELISA (µg/ml)	213,3	40,5
OPA (50 % de destrucción)	9232	591

Ejemplo 4-un ejemplo adicional de aminación reductora de 23F

23F-CRM-RA-116

Se disolvieron 150 mg de PS23F nativo (PS23FP114) a una concentración de 2 mg/ml en tampón fosfato 10°mM (pH 7,2) durante 4 horas. Después de la disolución, el pH se ajustó a pH 6,0 con HCl 1 N. Después se añadieron 0,4 equivalentes molares de peryodato (NaIO_4) a la solución de PS y se incubó durante 17 horas en la oscuridad a 25°C. La solución después se diafiltró (límite de 30 kDa) contra WFI y el PS oxidado se filtró sobre una membrana de 0,22 µm.

Se liofilizaron juntos 50 mg de PS oxidado y 75 mg de CRM197 (relación CRM/PS (p/p): 1,5/1) en presencia de un agente estabilizante. El PS + CRM197 liofilizado se solubilizó con 20 ml de DMSO durante 2 horas a temperatura ambiente (15-25°C). Se añadió después 1 equivalente molar de TAB (triacetoxiborohidruro de sodio) (13,7 mg) y después de 17 horas en agitación, se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/ml en NaOH 0,1 M) seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se diluyó 5 veces mediante la adición de WFI seguido de una diafiltración (límite de 30 kDa) frente a tampón fosfato 10°mM, NaCl 150°mM de pH 7,2. El conjugado se cargó en resina de DEAE y se eluyó en tampón fosfato 10°mM, NaCl 500°mM de pH 7,2. El conjugado se filtró finalmente sobre 0,22 µm. El conjugado resultante tiene una relación CRM/PS (p/p) final de 2,3/1.

Para conjugados adicionales, se añadió una segunda etapa de diafiltración después de la columna de DEAE con el fin de cambiar el tampón (NaCl 150°mM como tampón final).

Ejemplo 5 - conjugación de 6B con CRM197 utilizando aminación reductora (con diferentes relaciones proteína:sacárido y sacáridos 6B microfluidificados de diferentes tamaños) y química CDAP

6B-CRM-RA-122

Se diluyeron 200 mg de PS6B microfluidificado (84 kDa, 11,7 mg/ml) a 2 mg/ml en tampón fosfato 10°mM (pH 7,2). El pH se ajustó a pH 6,0 con HCl 1 N. Después se añadió 0,1 equivalente molar de peryodato (NaIO_4) a la solución de PS y se incubó durante 17 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. La solución después se diafiltró (límite de 30 kDa) contra WFI. Se liofilizaron juntos 50 mg de PS y 30 mg de CRM197 (relación de CRM/PS (p/p): 0,6/1) en presencia de un agente estabilizante. El PS + CRM197 liofilizado se solubilizó con 20 ml de DMSO durante 3 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 2,5 equivalentes molares de TAB (triacetoxiborohidruro de sodio) (38,7 mg) y después de 16 horas en agitación, se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/ml en NaOH 0,1 M) seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se diluyó 4 veces mediante la adición de WFI seguido de una diafiltración (límite de 100 kDa). El conjugado se filtró después sobre 0,22 µm. El conjugado resultante tiene una relación CRM/PS (p/p) final de 1,1/1.

6B-CRM-RA-123:

Se conjugó PS6B microfluidificado (84 kDa) con CRM197 como se describe para 6B-CRM-RA-122 excepto por que la etapa de liofilización se realizó utilizando una relación CRM197/PS (p/p) inicial de 2/1 y que se utilizaron 30 ml de DMSO para la disolución en la etapa del DMSO (en lugar de 20 ml). El conjugado resultante tenía una relación

CRM/PS (p/p) final de 3,0/1.

6B-CRM-RA-124:

Se diluyeron 200 mg de PS6B microfluidificado (350 kDa, 11,7 mg/ml) que tiene un peso molecular de 350 kDa a 2 mg/ml en tampón fosfato 10°mM (pH 7,2). El pH se ajustó a pH 6,0 con HCl 1 N. Después se añadió 0,1 equivalente molar de peryodato (NaIO_4) a la solución de PS y se incubó durante 17 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. La solución después se diafiltró (límite de 100 kDa) contra WFI. Se liofilizaron juntos 50 mg de PS y 60 mg de CRM197 (relación de CRM/PS (p/p): 1,2/1) en presencia de un agente estabilizante. El PS + CRM197 liofilizado se solubilizó con 20 ml de DMSO durante 5 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 2,5 equivalentes molares de TAB (triacetoxiborohidruro de sodio) (38,7 mg) y después de 16 horas en agitación, se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/ml en NaOH 0,1 M) seguido de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se diluyó 4 veces mediante la adición de WFI seguido de una diafiltración (límite de 100 kDa). El conjugado se filtró después sobre 0,22 μm . El conjugado resultante tiene una relación CRM/PS (p/p) final de 1,6/1.

6B-CRM-RA-125:

Se conjugó PS6B microfluidificado (350 kDa) con CRM197 como se describe para 6B-CRM-RA-124 excepto por que la etapa de liofilización se realizó utilizando una relación CRM197/PS (p/p) inicial de 2/1 y que la disolución en DMSO se realizó utilizando 33 ml (en lugar de 20 ml). El conjugado resultante tenía una relación CRM/PS (p/p) final de 2,9/1.

6B-CRM-003:

Se diluyeron 50 mg de PS6B microfluidificado a 10 mg/ml en agua (10 mg/ml). Se añadió NaCl en forma sólida para alcanzar una concentración final de 2 M. Se añadió una solución de CDAP (100 mg/ml recién preparada en acetonitrilo/WFI 50/50 v/v) para alcanzar la relación CDAP/PS apropiada (1,5 mg/mg de PS). Después de 1,5 minutos, el pH se elevó hasta el pH de activación 9,5 mediante adición de NaOH 0,1 N y se estabilizó a este pH hasta la adición de CRM197. Después de 3 minutos, se añadió CRM197 (10 mg/ml en NaCl 0,15 M) para alcanzar una relación CRM197/PS (p/p) de 2; el pH se mantuvo al pH de acoplamiento 9,5. La solución se dejó durante 2 horas en regulación del pH.

Después de la etapa de acoplamiento, se añadieron 2,5 ml de solución de glicina 2 M a la mezcla. El pH se ajustó al pH de desactivación (pH 9,0). La solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después el conjugado se filtró utilizando un filtro de 5 μm y se inyectó en una columna de Sephacryl S400HR (XK26/100) para retirar las moléculas pequeñas (incluyendo el DMAP) y el PS no conjugado y la proteína. El caudal se fijó a 30 ml/h. La elución se realizó en NaCl 150°mM. Las fracciones interesantes se agruparon y se filtraron sobre Millipack 20. El conjugado resultante tenía una relación CRM197/PS (p/p) final de 1,5/1.

6B-CRM-RA-144

Se diluyó 1 g de PS6B microfluidificado (245 kDa, 9,47 mg/ml) a 2 mg/ml en tampón de fosfato 10°mM (pH 7,2). El pH se ajustó a pH 6,0 con HCl 1 N. Después se añadió 0,1 equivalente molar de peryodato (NaIO_4) a la solución de PS y se incubó durante 18 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Después, la solución se diafiltró frente a WFI (Sartocon Slice200 Hydrosart 100 kDa). Se liofilizaron juntos 200 mg de PS oxidado y 240 mg de CRM197 (relación CRM/PS (p/p): 1,2/1) en presencia de un agente estabilizante. El PS + CRM197 liofilizado se solubilizó con 80 ml de DMSO durante 6 horas a 25°C. Después se añadieron 2,5 equivalentes molares de TAB (triacetoxiborohidruro de sodio) (154,9 mg) y después de 16 horas en agitación a 25°C, se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH_4 (100 mg/ml en NaOH 0,1 M) y se incubaron durante 30 minutos. La solución se diluyó 5 veces en WFI y después de 30 minutos se diafiltró 10 veces con NaCl 150°mM y luego 5 veces con PO_4 (K/K_2) 10 mM de pH 7,2 + NaCl 150°mM (Sartorius Sartocon Slice 200 Hydrosart 100 kDa). Después el retenido se cargó en una columna de DEAE (XK26/40). La columna se lavó con PO_4 (K/K_2) 10 mM de pH 7,2/tampón NaCl 150°mM. El conjugado se eluyó con PO_4 (K/K_2) 10 mM de pH 7,2/tampón NaCl 500°mM. El eluido se concentró y se diafiltró con 5 volúmenes de NaCl 150°mM y después se filtró sobre un filtro de 0,22 μm . El conjugado resultante tiene una relación CRM/PS (p/p) final de 1,6/1.

Ejemplo 6 - Inmunogenicidad de conjugados 6B-CRM19T fabricados mediante aminación reductora y química CDAP

Se inmunizaron grupos de 40 ratones Balb/c hembra (de 4 semanas de edad) por vía intramuscular tres veces en los días 0, 14 y 28 con 0,1 μg de conjugados PS6B producidos mediante aminación reductora o química CDAP formulada en AlPO_4 . Se utilizó PS6B-PD como punto de referencia. Los ratones se sangraron el día 42 y la respuesta de anticuerpos dirigida contra cada antígeno se midió por ELISA y OPA.

Se inmunizaron grupos de 20 conejillos de indias hembra (150 g de Hartley) por vía intramuscular tres veces en los días 0, 14 y 28 con 0,25 μg de conjugados PS6B producidos por aminación reductora o química CDAP adyuvada con AlPO_4 . Se utilizó PS6B-PD como punto de referencia. Los conejillos de indias se sangraron el día 42 y la

respuesta de anticuerpos dirigida contra cada antígeno se midió por ELISA y OPA.

OPA en ratón y conejillo de indias

- 5 Las muestras de suero se calentaron durante 45 min a 56°C para inactivar cualquier complemento endógeno restante. Se diluyeron en serie (doble) alícuotas de veinticinco microlitros de cada muestra de suero diluida 1:2 en 25 µl de tampón OPA (HBSS-FBS inactivado al 14,4 %) por pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo. Posteriormente, se añadieron 25 µl de una mezcla de células activadas HL-60 (1×10^7 células/ml), inóculo neumocócico activo recién descongelado y complemento de conejo bebé recién descongelado en una relación de por ejemplo 4/2/1 (v/v/v) a los sueros diluidos para producir un volumen final de 50 µl. La placa de ensayo se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación orbital (210 rpm) para promover el proceso fagocítico. La
- 10 reacción se detuvo mediante la colocación de la microplaca en hielo durante al menos 1 minuto. Una alícuota de 20 µl de cada pocillo de la placa se transfirió después al pocillo correspondiente de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano y se añadieron 50 µl de caldo Todd-Hewitt-agar al 0,9 % a cada pocillo. Después de la incubación durante la noche a 37 °C y CO₂ al 5 %, las colonias de neumococos que aparecieron en el agar se contaron utilizando un sistema de análisis de imagen automatizado (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se utilizaron
- 15 ocho pocillos sin muestra de suero como controles bacterianos para determinar el número de neumococos por pocillo. El número medio de CFU de los pocillos de control se determinó y se utilizó para el cálculo de la actividad letal para cada muestra de suero. El título de OPA para las muestras de suero se determinó mediante la dilución recíproca de suero capaz de facilitar la destrucción del 50 % de los neumococos. El título opsonofagocítico se calculó mediante el uso de un análisis ajustado a una curva de 4 parámetros.
- 20 La Tabla 3 describe los niveles de GMC obtenidos mediante inmunización de ratones Balb/c con los conjugados fabricados utilizando los procedimientos del ejemplo 4.

Tabla 3

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Sujeto/Resultado	PS06B-CRM122 (R: 1/1. PS 85)	PS06B-CRM123 (R: 3/1. PS 84 kDa)	PS06B-CRM124 (R: 1,5/1. PS 350 kDa)	PS06B-CRM123 (R: 2,9/1. PS 350 kDa)	PS06B-CRM003 (CDAP)	PS06B-PD
GMC (UGML)	0,83	0,37	1,18	0,54	0,31	0,10
Respondedores (%)	31/40	26/40	33/40	29/40	29/40	15/40

5 La inmunogenicidad de estos conjugados en ratones balb/c se describe en la figura 3. Juntas la figura 3 y la tabla 3 demuestran que en el modelo de ratón los conjugados producidos por aminación reductora fueron comparables a aquellos producidos utilizando química CDAP. En particular, la figura 3 demuestra que la inmunogenicidad de los conjugados producidos utilizando aminación reductora fue mayor que la inmunogenicidad del conjugado fabricado utilizando química CDAP.

La tabla 4 describe los niveles de GMC obtenidos mediante la inmunización de conejillos de los indias con los conjugados fabricados utilizando los métodos del ejemplo 4.

Tabla 4

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Sujeto/Resultado	PS06B-CRM122 (R: 1/1. PS 84 kDa)	PS06B-CRM123 (R: 3/1. PS 84 kDa)	PS06B-CRM124 (R: 1,5/1. PS 350 kDa)	PS06B-CRM123 (R: 2,9/1. PS 350 kDa)	PS06B-CRM003 (CDAP)	PS06B-PD
GMC (UG-ML)	3,51	7,70	2,84	19,93	3,70	1,55
Respondedores (%)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20

La inmunogenicidad de estos conjugados en conejillos de indias se describe en la figura 4. Al igual que en los experimentos realizados en el modelo de ratón, los resultados de la tabla 4 y la figura 4 muestran que los conjugados producidos mediante aminación reductora fueron comparables a aquellos producidos utilizando química CDAP, en particular, el PS06B-CRM125 demostró niveles de GMC y inmunogenicidades significativamente más altos que el conjugado producido utilizando CDAP.

Ejemplo 7 Conjugación del Hib con el toxoide tetánico mediante aminación reductora

Hib-IQ4-LS080

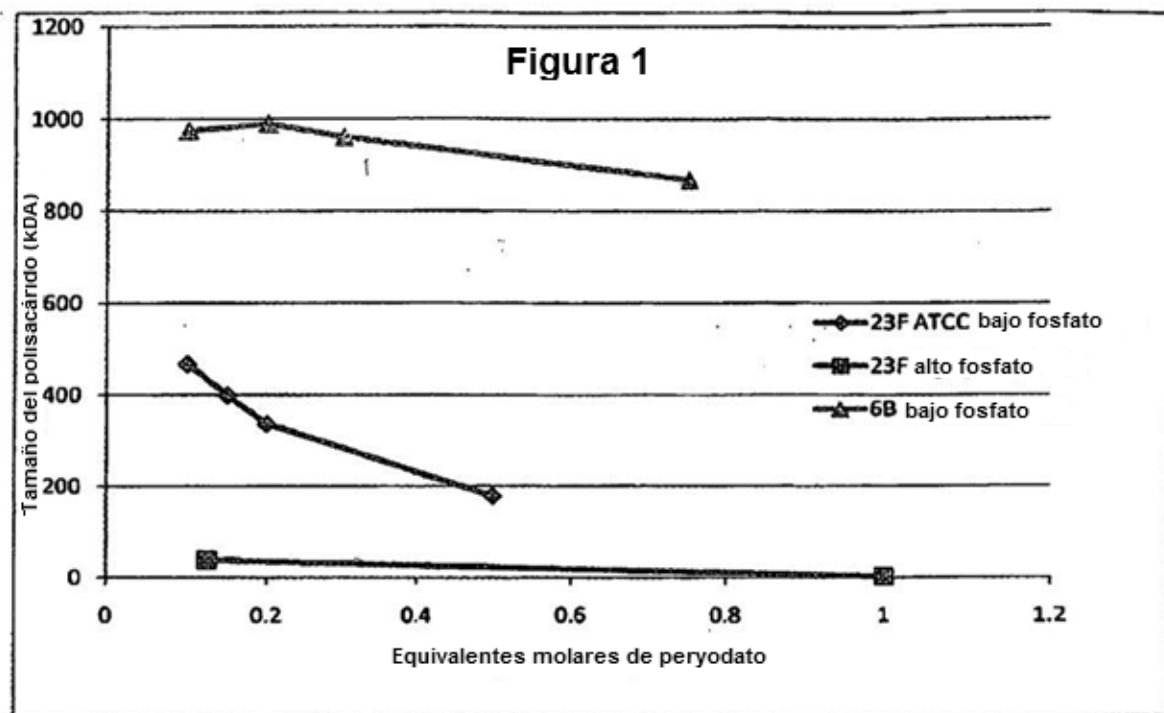
Se disolvieron 2,9 g de PS (dosificación de orcinol, lote AHIBCPA007) en 260 ml de tampón fosfato (Na/K₂) 10°mM de pH 6,2 durante 4h30 a temperatura ambiente y después durante la noche a +4°C. El seguimiento de la viscosidad se realizó durante la disolución. Después de 4 horas de disolución la viscosidad parecía ser estable. El PS se diluyó a 10 mg/ml con tampón fosfato y luego se oxidó en la oscuridad con 0,07 equivalentes molares de NaIO₄ durante 60 minutos. El PS oxidado se diafiltró (Sartorius Hydrosart 2 kDa) frente a de 3,5 volúmenes de tampón fosfato y después se filtró sobre un filtro de 22 µm. El número de unidades de repetición obtenido después de la oxidación se estimó por RMN ¹H y se descubrió que era aproximadamente de 21.

Hib-TT-LS210, 212 y 213

Se mezclaron 200 mg de PS oxidado (14,56 mg/ml) con 300 mg de TT (31,18 mg/ml, relación TT/PS (p/p): 1,5/1) y se diluyeron a 4 mg/ml con 36,64 ml de tampón fosfato 10°mM (Na/K₂) de pH 6,2. La solución se liofilizó en presencia de un agente estabilizante. El PS + TT liofilizado se solubilizó con 20 ml de DMSO durante 6 horas a 25°C. Después se añadieron 10 mEq de TAB (triacetoxiborohidruro de sodio) (38,7 mg) y después de 16 horas en agitación, se añadieron 2 equivalentes molares de NaBH₄ (100 mg/ml en NaOH 0,1 M) seguido de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se diluyó 3 veces mediante la adición de WFI seguido de una etapa de diafiltración (5 volúmenes de WFI seguidos de 5 volúmenes de tampón acetato 10°mM NaCl 150°mM pH 6,2, 100 kDa MWCO). La muestra después se cargó en resina Sephacryl S300HR. La elución se realizó en de tampón de acetato 10°mM utilizando NaCl 150°mM (pH 6,2). Las fracciones de Interés se agruparon y se filtraron sobre un filtro de 0,22 µm. Los conjugados resultantes tenían una relación TT/PS (p/p) final de 2,1/1.

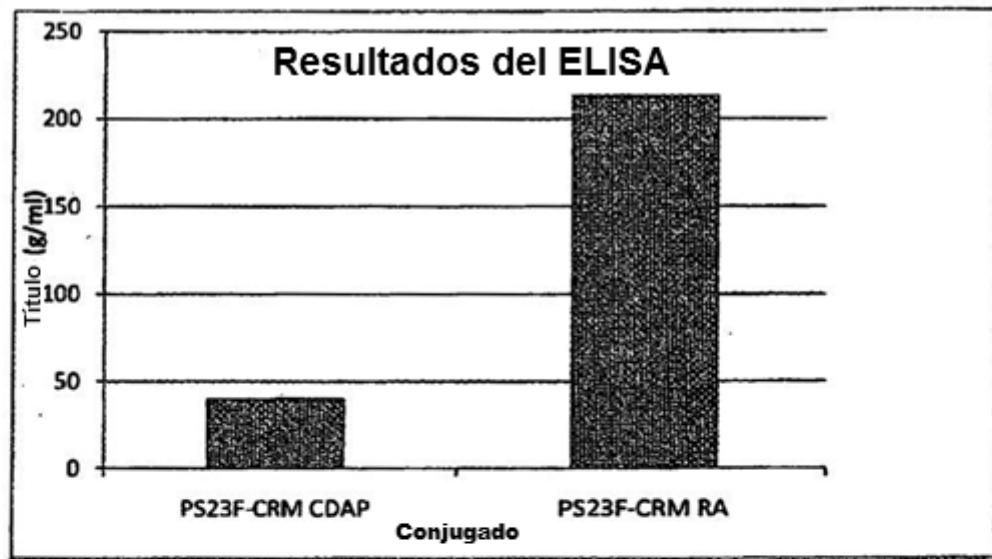
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de conjugación de un sacárido bacteriano que comprende las etapas de
 - a) hacer reaccionar el sacárido bacteriano con 0,001-0,7 equivalentes molares de peryodato para formar un sacárido bacteriano activado;
 - 5 b) mezclar el sacárido bacteriano activado con una proteína transportadora;
 - c) hacer reaccionar el sacárido bacteriano activado y la proteína transportadora con un agente reductor para formar un conjugado;
 - o
 - a) hacer reaccionar el sacárido bacteriano con 0,001-0,7, equivalentes molares de peryodato para formar un sacárido bacteriano activado;
 - 10 b) mezclar el sacárido bacteriano activado con un enlazador;
 - c) hacer reaccionar el sacárido bacteriano activado con el enlazador utilizando un agente reductor para formar un sacárido bacteriano-enlazador;
 - d) hacer reaccionar el sacárido bacteriano-enlazador con una proteína transportadora para formar un conjugado,
- 15 en el que la etapa a) ocurre en un tampón que no contiene ningún grupo amino y el tampón tiene una concentración de entre 1-100 mM y en el que el sacárido bacteriano es el sacárido capsular 6B de *S. pneumoniae*.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el tampón se selecciona entre el grupo que consiste en tampón fosfato, tampón borato, tampón acetato, tampón carbonato y tampón citrato opcionalmente en el que el tampón tiene una concentración de entre 1-50 mM, 1-25 mM, 1-10 mM, 5-15 mM, 8-12 mM, 10-50 mM o aproximadamente 20 10 mM.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en el que el pH en la etapa a) es pH 3,5-8,0, 5,0-7,0 o pH 5,5-6,5 o aproximadamente pH 6,0.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que el peso molecular promedio del sacárido bacteriano es de entre 1-1100 kDa, 100-470 kDa, 200-300 kDa, 600-1100 kDa u 800-1000 kDa después de la etapa 25 a).
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la proteína transportadora se selecciona entre el grupo que consiste en toxoide tetánico, fragmento C del toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, neumolisina, proteína D, PhtD, PhtDE y N19.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente reductor comprende 30 cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende una etapa adicional e) de purificación del conjugado.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que contiene una etapa adicional de mezcla del conjugado con antígenos adicionales opcionalmente, en el que los antígenos adicionales comprenden al menos 7, 8, 35 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sacáridos de *S. pneumoniae* seleccionados entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F.
9. El procedimiento de la reivindicación 8 en el que los antígenos adicionales comprenden una o más proteínas de *S. pneumoniae* seleccionadas entre el grupo que consiste en la familia de poli-histidina en triada (PhtX), la familia de proteínas de unión a la colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) de truncado de CbpX-truncado de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y 40 SP133.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el conjugado se mezcla con un adyuvante o un excipiente farmacéuticamente aceptable.



a)

Figura 2



b)

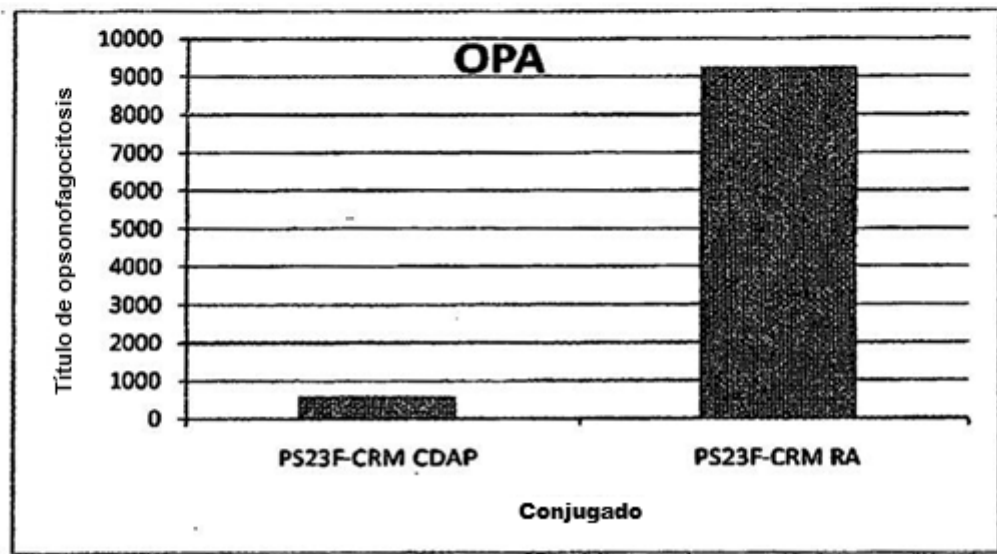


Figura 3

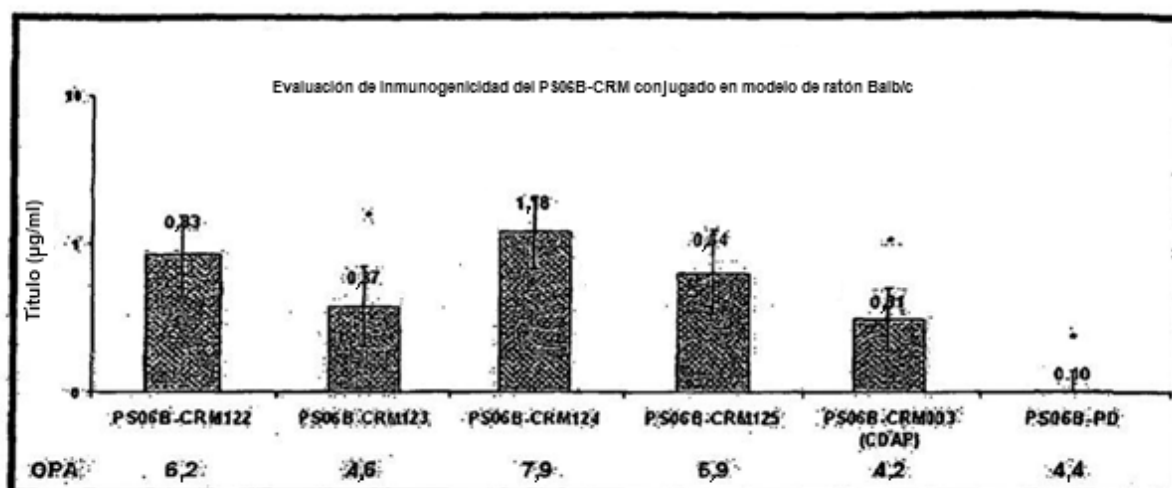


Figura 4

